ALK Break Apart DNA-FISH Probe

Sonde "Break Apart", Bicolore

REF 21-002

IVD CE

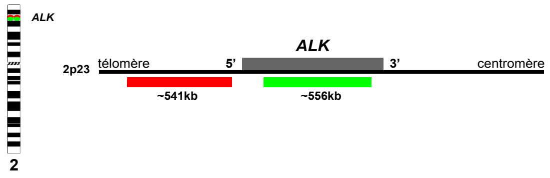
-20°C

CGI ITALIA
Empowering Personalized Cancer Treatment

Mode d'emploi

Usage prévu

La sonde *ALK* «Break-Apart» de Cancer Genetics Italia est conçue pour détecter la translocation entre le gène *ALK* situé en 2p23 et l'un de ses 14 loci partenaires de translocation par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH).[1] La translocation du gène *ALK* se produit dans environ 50% des cas de lymphome anaplasique à grandes cellules (ALCL) avec une translocation t(2;5)(p23;q35), déterminée par cytogénétique conventionnelle; dans de tels cas, la présence de la translocation t(2;5)(p23;q35) supporte un pronostic globalement meilleure pour les patients ALCL.[2] La translocation du gène *ALK* a été observée dans les tumeurs vésicales inflammatoires myofibroblastique (IMT) de la vessie (> 66%)[3,4] et sert de biomarqueur pour le diagnostic différentiel de l'IMT à partir de lésions sarcomateuses.[3] La translocation du gène *ALK* est observée dans environ 5% à 16% des cas de cancer du poumon non à petites cellules[5] sous la forme d'inv(2)(p21p23), déterminée par FISH,[5] et sert de biomarqueur pour la réponse thérapeutique.[5,6] La présence de la translocation *ALK* chez les patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules est corrélée avec une sensibilité marquée aux traitements de incluant du pemetrexed et du crizotinib.[7]



Représentation schématique de la sonde DNA-FISH *ALK* «Break-Apart»:
Les barres horizontales rouges et vertes indiquent les régions couvertes par les sondes (approximativement à l'échelle,GRCh37/Hg19/2009). Les sondes directement marquées *ALK* 5' (rouge) et *ALK* 3' (verte) flanquent les points de cassure du gène.

Conservation

À l'arrivée, conserver le produit à - 20°C, à l'abri de la lumière, jusqu'à la date de péremption.
Conservation des lames : Conserver les lames hybridées a -20°C, à l'abri de la lumière.

Remarque: Ces conditions de conservation s'appliquent à la fois aux produits non ouverts et ouverts. Le nombre de cycles de gel-dégel ne doit pas dépasser le nombre de tests recommandés par flacon. Conserver dans le flacon d'origine. Les flacons conservés dans d'autres conditions peuvent ne pas offrir de performance optimale et par conséquent affecter les résultats du test.

Manipulation

- Tous les réactifs doivent être manipulés comme s'ils étaient capables de transmettre des agents infectieux. Après usage, tout le matériel doit être éliminé conformément à la loi nationale en vigueur.
- Manipuler tous les réactifs et lames contenant des fluorophores en éclairage réduit, afin d'éviter toute détérioration du signal fluorescent.

Avertissements et mises en garde

Lire le mode d'emploi avant toute utilisation.

- Tout transport ou conservation impropre peut détruire ou détériorer la performance du produit.
- En cas de réception d'emballage ou de flacon endommagé, de défaillance du dispositif (après utilisation conforme au mode d'emploi) ou de blessure de l'utilisateur, contacter le fabricant.
- Tout flacon endommagé doit être éliminé conformément à la loi nationale en vigueur et aucun essai ne doit être réalisé à partir d'un tel réactif.
- Manipuler tous les réactifs avec soin et porter un équipement de protection individuelle approprié.
- Le formamide, la solution saline de citrate de sodium (SSC/Saline-Sodium Citrate) et le dodécyl sulfate de sodium (SDS) peuvent avoir des effets tératogènes et mutagènes : éviter toute inhalation, ingestion ou contact avec la peau.
- Le DAPI est un irritant. Consulter le Material Safety Data Sheet (MSDS) du produit pour les informations concernant la sécurité.

Réactif fourni

Sonde DNA-FISH prête à l'emploi : 100 µL par flacon (10 tests). Un test est défini comme suffisant pour une aire de 22mm x 22mm.

Sonde étiquetée au fluorophore pour le locus *5' ALK* (rouge) et au fluorophore pour le locus *3' ALK* (vert), prémélangée avec de l'ADN bloquant et un tampon d'hybridation (formamide, sulfate de dextran, SSC et SDS).

Réactifs et matériel nécessaire mais non fournis

Equipements		Reactifs
Bocal coplin	Microtube à centrifuger	Étanol à 100%
Lamelles couvre-objets	(0,5 mL)	PBS 10X
(22x22 e 25x25)	Micropipettes (1 à 200 mL)	HCl 1N
Microscope à épifluores-	Parafilm	$MgCl_2$ 1M
cence	pH-mètre	NaOH 1M
Pinces	Lames plus	NaSCN 1M
Hotte aspirante	Colle de caoutchouc	SSC 20X
Gants	Plateau pour lames	Formaline à 10%
Chambre humidifiée	Thermomètre, calibrè	DAPI et Antifade
Huile d'immersion	(37°C to 80°C)	Eau distillée
Incubateur	Plaque chauffante	Pepsine
Lampe à mercure (100 watts)	Bain-marie	20 Tween
Microcentrifugeuse		

Citrisolv™ est une marque enregistrée de Fisherbrand.

Préparation des réactifs

Remarque: Utiliser de l'eau distillée pour la préparation de toutes les solutions-mères et de toutes les solutions de travail.

Série d'éthanol (70%, 85% et 100%): Préparer des dilutions vol/vol d'éthanol à 100% et d'eau distillée. Conserver à TA.

HCl 0,01N (acide chlorhydrique): Ajouter 0,5 mL de HCl 1N à 49,5 mL d'eau distillée. Conserver à TA. Préchauffer la solution à 37°C dans un bain-marie avant usage.

Solution-mère de pepsine à 0.4% (4 mg/mL): Dissoudre 100 mg de pepsine dans 25 mL de HCL 0.2N. Conserver des aliquots de 500 µL à - 20°C.

Formaldéhyde à 1%: Ajouter 12,5 mL de formaline à 10% (4% formaldehye) à 37 mL de PBS 1X. Ajouter 500 µL de $MgCl_2$ 100X. Conserver à 4°C jusqu'à une semaine.

SSC 0,5X(Citrate de sodium salin)/Tween 20 à 0,1%: Ajouter 25 mL de SSC 20X et 1 mL de Tween 20 à 974 mL d'eau distillée. Bien mélanger en tournoyant. Conserver à TA.

PBS 1X (solution saline dans un tampon phosphate): Mélanger 100 mL de PBS 10X et 900 mL d'eau distillée. Ajuster le pH à 7,0. Conserver à TA.

SSC 2X: Mélanger 100 mL de SSC 20X et 900 mL d'eau distillée. Ajuster le pH à 7,0. Conserver à température ambiante (TA).

SSC 2X/Tween 20 à 0,1%: Ajouter 100 mL de SSC 20X et 1 mL de Tween 20 à 899 mL d'eau distillée. Bien mélanger en tournoyant. Conserver à TA.

$MgCl_2$ 100X (Chlorure de magnesium) dans PBS 1X: Ajouter 50 µL de MgCl2 1M a 450 µL de PBS 1X.

Procédure Standard for FISH

Remarque: Produit prêt à l'emploi. Ne pas reconstituer ni diluer. Pour usage professionnel uniquement.

- Seul(e) un(e) technologiste médical(e) familiarisé(e) avec les méthodes de cytogénétique et formé(e) à la technique FISH peut réaliser le test. Tout l'équipement doit être étalonné avant la réalisation du test.
- Le tissu visé est du sang périphérique et la moelle osseuse. Les lames doivent être préparées conformément aux directives des méthodes cytogénétiques standards du laboratoire réalisant le test.

Préparation des lames

Toutes les lames fraîchement préparées doivent être vieillies pendant 1 heure et demie à 45 -50°C avant l'hybridation. Si l'hybridation n'a pas lieu le même jour que la préparation, conserver les lames à 4°C ou à - 20°C. Les lames avec des cellules à cytoplasme visible peuvent nécessiter un prétraitement à l'aide d'un enzyme protéolytique du type pepsine (voir prétraitement facultatif à la pepsine).

Prétraitement facultatif des lames à la pepsine

1. Préchauffer 50 mL de HCl 0,01N à 37°C.
2. Ajouter 10 à 15 µL de solution-mère de pepsine à 0.4% aux 50 mL de HCl 0,01N préchauffés et incuber la lame pendant 5 à 10 min à 37°C dans la pepsine.

   Remarque sur la procédure: Certains spécimens peuvent nécessiter des temps de digestion plus longs dans la pepsine.

3. Laver deux fois la lame pendant 5 min dans une solution PBS 1X à température ambiante (TA).
4. Incuber la lame pendant 5 min du formaldéhyde à 1% à TA.
5. Laver la lame pendant 5 min dans une solution PBS 1X à TA.

(Suite à la page suirante)

Procédure Standard for FISH

6. Déshydrater la lame dans de l'éthanol à 70%, 85% et 100% à TA pendant 1 min chacun.
7. Laisser sécher la lame à l'air libre.

Remarque sur la procédure: Vérifier la morphologie de l'échantillon à l'aide d'un microscope à contraste de phase avant l'hybridation. Ne pas hybrider en cas de compromission de la morphologie nucléaire.

Dénaturation/hybridation de la sonde DNA-FISH

1. Vortexer brièvement la sonde DNA-FISH et centrifuger le tube dans une microcentrifugeuse pendant 30 secondes.
2. Appliquer 10 µL de sonde DNA-FISH sur la zone cible sur la lame et la recouvrir d'une lamelle couvre-objet (22 x 22 mm).

Remarque sur la procédure: Prendre soin d'éviter toute formation de bulles d'air. Des lamelles couvre-objets plus petites ou plus grandes peuvent être utilisées en fonction du changement proportionnel de volume de la sonde DNA-FISH.

3. Sceller soigneusement les bords de la lamelle couvre-objet à l'aide de colle de caoutchouc.
4. Co-dénaturer la lame et la sonde DNA-FISH pendant 3 min à 80°C sur une plaque chauffante à température controlée.
5. Incuber pendant 12 à 18 heures dans une chambre humidifiée à 37°C, à l'abri de toute lumière directe.

Lavage post-hybridation

Remarque sur la procédure: Eviter de faire sécher la lame avant que le lavage soit fini.

1. Préchauffer les solutions de SSC 2X/Tween 20 à 0,1% et de SSC 0,5X/Tween 20 à 0,1% à 45°C.
2. Retirer la colle de caoutchouc de la lame à l'aide de pinces.
3. Tremper brièvement la lame dans la solution de SSC 2X à TA. Retirer la lamelle couvre-objet.
4. Laver la lame pendant 2 x 5 min dans une solution de SSC 2X/Tween 20 à 0,1% à 45°C.
5. Laver la lame pendant 2 x 5 min dans une solution de SSC 0,5X/Tween 20 à 0,1% à 45°C.
6. Rincer brièvement la lame dans de l'eau distillée.
7. Laisser sécher la lame à l'air libre à l'abri de la lumière directe.
8. Appliquer 20 µL de DAPI/Antifade à la zone hybridée et recouvrir d'une lamelle couvre-objet (25 x 25 mm).

Procédure pour section FFPE

Remarque: Produit prêt à l'emploi. Ne pas reconstituer ni diluer. Pour usage professionnel uniquement.

» Seul un(e) technologiste familiarisé(e) avec les méthodes de cytogénétique et formé(e) à la technique FISH peut réaliser le test. Tout l'équipement doit être étalonné avant la réalisation du test.

» Le tissu visé correspond à des sections FFPE de 4 à 5 µm d'épaisseur. Les lames doivent être préparées conformément aux directives des méthodes cytogénétiques standards du laboratoire réalisant le test.

Préparation des lames

Remarque sur la procédure: Simultanément aux coupes sériées utilisées pour l'analyse FISH, une ou des coupe(s) doivent être préparées pour coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (H & E).

1. Les coupes pour essai FISH doivent être montées sur des lames Plus enrobées.
2. Cuire les lames sur la nuit (12 à 18 heures) à 55 °C avant l'hybridation. Utilise sous 3 jours.

Prétraitement des lames (à réaliser sous une hotte à aspiration)

1. Déparaffiner la lame dans 3 bains de CitriSolv™ de 10 min chacun, à TA.

Remarque sur la procédure: Les bocaux de CitriSolv™peuvent être utilisés deux fois. Toutefois, le troisième bocal doit contenir du réactif encore inutilisé.

2. Déshydrater la lame en l'incubant dans deux bains d'éthanol à 100 % de 5 min chacun, à TA. Sécher à l'air (peut rester a TA pendant plusieurs heures).

Remarque sur la procédure: La lame peut être conservée sèche à TA pendant plusieurs heures.

3. Incuber la lame dans du HCl 0,2N pendant 20 min, à TA.
4. Rincer la lame dans un bain d'eau distillée pendant 1 min à TA et 2 bains de SSC 2X de 5 min chacun, à TA.
5. Incuber la lame dans une solution de NaSCN 1M préchauffée pendant 10 min à 80°C.

Remarque sur la procédure: Certain types de tissus, tel le tissue mammaire, nécessitent un temps d'incubation plus long (30-60 minutes).

6. Rincer la lame dans un bain d'eau distillée et 2 bains de SSC 2X de 5 min chacun, à TA.
7. Mettre la lame soit dans une chambre humide ou dans un Thermobrite. Couvrir la zone cible avec au moins 100 mL de pepsine 0,4%, garder la lame en cours d'incubation dans des conditions humides. Ne pas laisser l'échantillon se dessécher.
8. Incuber pendant 10 min à 37 °C.

Remarque sur la procédure: Cette durée peut devoir être ajustée en fonction des conditions de fixation et de l'âge de la coupe.

9. Rincer la lame pendant 5 min dans de l'eau distillée, à TA.
10. Rincer la lame en deux bains de SSC 2X de 5 min chacun, à TA. Plonger brièvement dans de l'eau distillée et sécher à l'air.
11. Incuber la lame dans du formol neutre tamponné à 10 % pendant 15 min, à TA.
12. Rincer la lame en 2 changements de SSC 2X de 5 min chacun, à TA.
13. Plonger brièvement dans de l'eau distillée et sécher à l'air.

Dénaturation/hybridation de la sonde DNA-FISH

1. Vortexer la sonde DNA-FISH pendant 2 à 3 secondes et centrifuger le tube dans une microcentrifugeuse.
2. Appliquer 10 µL de sonde DNA-FISH à la zone cible sur la lame et la recouvrir d'une lamelle couvre-objet (22 x 22 mm).

Remarque sur la procédure: Prendre soin d'éviter toute formation de bulles d'air. Des lamelles couvre-objets plus petites ou plus grandes peuvent être utilisées en fonction du changement proportionnel de volume de la sonde DNA-FISH.

3. Sceller soigneusement les bords de la lamelle couvre-objet à l'aide de colle de caoutchouc.
4. Co-dénaturer la lame et la sonde DNA-FISH pendant 5 min à 90 °C sur une plaque chauffante à température contrôlée.
5. Incuber pendant 12 à 18 heures dans une chambre humidifiée à 37 °C, à l'abri de toute lumière directe.

Lavage post-hybridation

Remarque sur la procédure: Ne pas laisser la lame sécher avant la fin des lavages.

1. 1. Retirer la colle de caoutchouc de la lame à l'aide de pinces.
2. Tremper la lame dans la solution SSC 2X à TA et retirer la lamelle couvre-objet.
3. Laver la lame pendant 2 x 5 min dans une solution de SSC 2X/Tween 20 à 0,1 % à 45°C.
4. Rincer la lame en la trempant dans de l'eau distillée.
5. Laisser sécher la lame à l'air libre à l'abri de la lumière directe.
6. Appliquer 20 µL de DAPI/antifade à la zone hybridée et recouvrir d'une lamelle couvre-objet (25 x 25 mm).

Remarque sur la procédure: Selon la fixation, l'âge de la coupe et les conditions de prétraitement, on peut apercevoir un bruit de fond vert. Si le bruit de fond vert est excessif ou interfère avec l'attribution de score, les lames peuvent être relavées de manière plus stringente.

Avant le relavage, retirer l'antifade en enlevant la lamelle couvre-objet et en procédant au lavage en deux changements de solution SSC 2X/Tween 20 à 0,1 % de 5 min chacun avec agitation, à TA. Procéder immédiatement au relavage, ne pas laisser la lame sécher.

La stringence peut être accrue en ajoutant une étape de lavage de 2 x 5 min, dans une solution de SSC 0,5X/Tween 20 à 0,1 % à 45 °C. Une stringence supplémentaire peut être obtenue en augmentant la durée de lavage et/ou la température (jusqu'à 65 °C).

Accessoires pour microscope

» Objectifs

Un objectif 10X est adapté au balayage de la zone cible. Un grossissement supérieur s'avère nécessaire pour l'analyse des signaux et doit avoir lieu avec un objectif à immersion à huile 63X ou 100X.

» Huile d'immersion

L'huile d'immersion doit être adaptée à la microscopie en fluorescence.

» Lampe

Une lampe à mercure de 100 watts avec une durée de vie maximale de 200 heures est recommandée. Remplacer la lampe avant qu'elle ne dépasse les 200 heures.

» Filtres recommandés

Fluorophore	Excitation $_{max}$	Émission $_{max}$
Verte	496 nm	520 nm
Rouge	580 nm	603 nm
DAPI	360 nm	460 nm

(*Suite à la page suirante*)

Visualisation et interprétation des signaux

Le signal doit être visualisé à l'aide d'un microscope à épifluorescence équipé des filtres appropriés.

Remarque sur la procédure: Les signaux peuvent être à différents plans focaux, c'est pourquoi il est important de focaliser vers le haut et vers le bas des spécimens, afin de s'assurer du comptage de tous les signaux.

» Dans les noyaux normaux en interphase et les chromosomes en métaphase, la sonde DNA-FISH *ALK* «Break-Apart» génère deux signaux de fusion (rouge/vert ou jaune) correspondant aux deux chromosomes 2 normaux.

» Dans les cellules avec réarrangements chromosomiques mettant en jeu le gène *ALK*, le modèle le plus couramment observé est un signal de fusion représentant le chromosome 2 normal, ainsi qu'un signal rouge et un signal vert, représentant les chromosomes dérivés.

Recommendations and limitations

» Ce produit a été optimisé pour être utilisé sur des lames préparées à partir de spécimens de sang périphérique, et de moelle osseuse et FFPE conformément aux méthodes cytogénétiques courantes. Le fabricant garantit que ce produit répond aux caractéristiques de performance analytique (sensibilité, spécificité, reproductibilité et intervalle de validité) établies sur du sang périphérique normal ou des tissus prévus.

» Chaque nouveau lot de sonde DNA-FISH doit être testé pour la spécificité du locus sur un spécimen de sang périphérique normal et sur le tissu prévu, pour vérifier la bonne performance du réactif. Il incombe au laboratoire d'établir les intervalles de validité à l'aide de spécimens de controle positifs et négatifs du tissu prévu.

» L'utilisation de filtres aux caractéristiques spectrales autres que celles spécifiées peut affecter négativement la force du signal. Par exemple, le fluorophore rouge est visible à travers un filtre orange, mais les signaux apparaissent faibles.

» La technique FISH sur métaphase est recommandée pour caractériser les variantes et les patrons de signaux anormaux atypiques.

» Le test FISH est considéré comme une adjonction à la cytogénétique classique (caryotype). Les résultats de ces tests doivent être interprétés dans la totalité du contexte des antécédents cliniques du patient. Aucune décision médicale ne peut être prise en se fondant uniquement sur les résultats du test FISH.

Glossaire des symboles

LOT Numéro de lot

Risques biologiques

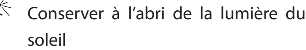
REF Numéro de catalogue

Attention, consulter la documentation d'accompagnement


Marquage CE de conformité

Contient suffisamment pour 10 tests

IVD Dispositif médical de diagnostic *in vitro*


Conserver à l'abri de la lumière du soleil


Fabricant

Limite supérieure de température

Utiliser avant le



Cancer Genetics Italia S.r.l.
Viale Luigi Majno, 17
20122 Milano - Italia
www.cancergeneticsitalia.com
support@cancergeneticsitalia.com

DNA-FISH Probe fabriquée dans la communanté européenne par Cancer Genetics Italia S.r.l.

Bibliographie

1. Huret, J. L., et al. www.AtlasGeneticsOncology.org.
2. Drexler, H. G., et al. Leukemia, 2000. 14(9):p.1533-59.
3. Freeman, A., et al. Mod Pathol, 2004. 17(7):p.765-71.
4. Sukov, W. R., et al. Mod Pathol, 2007. 20(5):p.592-603.
5. Kim, H. R., et al. Cancer, 2011 June 30.
6. Gerber, D. E., et al. Cancer Cell, 2010. 18(6):p.548-51.
7. Camidge, D. R., et al. J Thorac Oncol, 2011. 6(4):p.774-80.

Version: 05.31.12